WO9726910

Publication Title:

TUMOUR VACCINE FOR IMMUNOTHERAPY OF MALIGNANT TUMOURS

Abstract:

Abstract of WO9726910

The invention concerns a tumour vaccine in which the immunogenicity of tumour cells, tumour associated antigens or antigen partial structures are reinforced through genetic modification or through chemical bonding to an exogenous thermal shock protein. The use of microbial thermal shock proteins or their genes is preferred which are derived from mycobacteria, Escherichia coli or from Chlamydia trachomatis. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of http://v3.espacenet.com

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
A61K 39/00, 39/385

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/26910

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. Juli 1997 (31.07.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00172

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 1997 (27.01.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 02 985.6	27. Januar 1996 (27.01.96)	DE
196 04 380.8	7. Februar 1996 (07.02.96)	DE

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: MILLECK, Jürgen [DE/DE]; Rosenfelder Ring 66, D-10315 Berlin (DE). REICHARDT, Werner [DE/DE]; Fritz-Krieger-Strasse 10, D-07743 Jena (DE). BENNDORF, Rainer [DE/DE]; Strasse 52, Nr. 52, D-13125 Berlin (DE). LIEBRICH, Windfried [DE/DE]; Moselstrasse 43, D-16341 Zepernick (DE). SCHLAG, Peter [DE/DE]; Frohnauer Strasse 17 A, D-13467 Berlin (DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(54) Title: TUMOUR VACCINE FOR IMMUNOTHERAPY OF MALIGNANT TUMOURS

(54) Bezeichnung: TUMORIMPFSTOFF FÜR DIE IMMUNTHERAPIE VON MALIGNEN TUMOREN

(57) Abstract

The invention concerns a tumour vaccine in which the immunogenicity of tumour cells, tumour associated antigens or antigen partial structures are reinforced through genetic modification or through chemical bonding to an exogenous thermal shock protein. The use of microbial thermal shock proteins or their genes is preferred which are derived from mycobacteria, *Escherichia coli* or from *Chlamydia trachomatis*.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Tumorimpfstoff, bei dem die Immunogenität von Tumorzellen, tumorassoziierten Antigenen oder antigenen Teilstrukturen durch gentechnische Modifizierung oder durch chemische Bindung an ein exogenes Hitzeschockprotein verstärkt wird. Bevorzugt eingesetzt werden mikrobielle Hitzeschockproteine bzw. deren Gene, die aus Mycobakterien, *Escherichia coli* oder aus *Chlamydia trachomatis* erhalten werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Tumorimpfstoff für die Immuntherapie von malignen Tumoren

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Impfstoffes aus gentechnisch modifizierten Tumorzellen beziehungsweise aus biochemisch isolierten tumorassoziierten Antigenen oder synthetisch hergestellten antigenen Teilstrukturen für die Immuntherapie von malignen Tumoren. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die grundlegende Therapie solider maligner Tumoren ist die chirurgische oder strahlentherapeutische Entfernung des Primärtumors. Bei systemischen Formen der Krebserkrankung oder chirurgisch nicht erreichbaren Tumormetastasen führt man eine Chemotherapie durch oder versucht eine biologische Therapie. Theoretisch gesehen ist die Erzeugung einer gegen Krebszellen gerichteten Immunantwort, die zur Zerstörung der Krebszellen führt, das gesunde Gewebe aber nicht behelligt, die optimale Methode, um Tumormetastasen zu bekämpfen. Daß es prinzipiell möglich ist, eine gegen Krebszellen gerichtete Immunantwort zu erzeugen, wird durch Ergebnisse von Impfversuchen mit tierexperimentellen Tumoren sowie auch mit einigen Tumoren des Menschen belegt.

Es sind jedoch noch Hemmnisse zu überwinden, ehe diese Form der aktiven spezifischen Immunisierung zur Therapie von Krebserkrankungen eine breitere klinische Anwendung finden kann. Eines der größten Hemmnisse ist die geringe Immunogenität spontan entstandener Tumoren. Unstrittig ist, daß die meisten Tumoren, auch diejenigen des Menschen, tumorassoziierte Antigene besitzen, durch die sie sich vom gesunden Gewebe unterscheiden. Da Tumoren jedoch körpereigenes Gewebe darstellen, registriert das Immunsystem lediglich die Existenz tumorassoziierter Antigene auf den malignen Zellen, ist aber von sich aus nicht in

der Lage, eine wirksame Abwehrreaktion gegen die nativen Tumorzellen zustandezubringen.

Um eine wirksame immunologische Abwehrreaktion gegen maligne Tumoren hervorzurufen, ist es unerläßlich, die Immunogenität derjenigen Tumorzellen oder tumorassoziierten Antigene mit denen man eine Impfung vornehmen will, künstlich zu verstärken. Bei Tumorzellimpfstoffen kann dieses dadurch geschehen, daß man die Tumorzellen chemisch, enzymatisch oder durch Hinzufügen apathogener Viren bzw. abgeschwächter Tuberkelbakterien (BCG) äußerlich modifiziert oder gentechnisch durch Übertragung z.B. eines Zytokingens verändert (Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines, eds. Bystryn et al., Ann NY Acad Sci 690 (1993); Pardoll, Curr Opin Immunol 4, 619-623 (1992)). Subzelluläre, lösliche tumorassoziierte Antigene, z.B. Proteine oder Peptide mit entsprechenden immundominanten Epitopen aus Melanomzellen (van der Bruggen et al., Science 254, 1643-1647 (1991), Adenokarzinomen (Taylor-Papadimitriou et al., Ann NY Acad Sci 690, 69-79 (1993)) oder anderen Tumoren (Slingluff et al., Curr Opin Immunol 6, 733-740 (1994)) müssen an ein immunogenes Trägermolekül gebunden werden, um ihre schwache Immunogenität zu verstärken bzw. sie überhaupt immunogen zu machen. Peptide ohne Trägermolekül wirken in der Regel lediglich als Hapten, d.h. sie reagieren zwar mit einem entsprechenden peptidspezifischen Antikörper, können aber selbst keine Immunantwort hervorrufen. Als Trägermolekül werden bestimmte Serumproteine oder bakterielle Toxoide verwendet. Vor der Impfung wird dem Konjugat aus Peptid und Trägermolekül üblicherweise ein Adjuvans zugefügt, wodurch die Immunantwort nochmals verstärkt wird.

Prinzipiell wird die Immunantwort erkennbar an Hand der Bildung antigenspezifischer Antikörper und/oder T-Lymphozyten. Wie Ergebnisse von tierexperimentellen Untersuchungen und in-vitro-Tests mit humanen Tumorzellen zeigen, kommt es bei der Erzeugung einer therapeutisch

wirksamen Immunantwort gegen Krebszellen in erster Linie auf eine durch T-Lymphozyten vermittelte Immunität an und weniger auf die Bildung von Antikörpern (Hellström and Hellström, Ann NY Acad Sci 690, 24-33 (1993)). Allerdings existieren bisher keine klaren Vorstellungen darüber, wie man bei einer Impfung von Tumorpatienten mit tumorassoziierten Antigenen oder kurzkettigen Peptiden verfahren muß, um vor allem die Bildung tumorantigenspezifischer T-Lymphozyten hervorzurufen (Time of Truth for Cancer Vaccines, J Natl Cancer Inst 86, 330-331 (1994)).

Das Ziel der vorliegenden Erfindung war es deshalb, einen Tumorimpfstoff bereitzustellen, der es gestattet, sowohl Tumorzellen als auch tumorassoziierte Antigene oder antigene Teilstrukturen für eine wirksame Abwehrreaktion gegen native Tumorzellen einzusetzen. Die Aufgabe der Erfindung bestand dabei darin, die Immunogenität von als Impfstoff verwendeten Tumorzellen, tumorassoziierten Antigenen oder antigenen Teilstrukturen durch gentechnische Modifizierung der Tumorzellen beziehungsweise durch biochemische Modifizierung von tumorassoziierten Antigenen oder antigenen Teilstrukturen wirksam zu verstärken und dabei insbesondere die durch T-Lymphozyten vermittelte Immunität zu stimulieren.

Überraschend konnte diese Aufgabe durch gentechnische Modifizierung von Tumorzellen, die erfindungsgemäß zusätzlich das Gen eines exogenen Hitzeschockproteins enthalten oder durch Bindung von tumorassoziierten Antigenen oder antigenen Teilstrukturen an ein exogenes Hitzeschockprotein gelöst werden.

Der erfindungsgemäße Tumorimpfstoff enthält Tumorzellen, die das Gen eines exogenen Hitzeschockproteins enthalten beziehungsweise tumorassoziierte Antigene oder antigene Teilstrukturen, die an ein exogenes Hitzeschockprotein gebunden sind.

Bevorzugt wird ein mikrobielles Hitzeschockprotein beziehungsweise sein Gen verwendet. Besonders bevorzugt sind das Gen von Hitzeschockproteinen beziehungsweise Hitzeschockproteine aus Mycobakterien, Escherichia coli und aus Chlamydia trachomatis, insbesondere sind es die Hitzeschockproteine HSP65 und HSP70 aus Mycobakterien, HSP70 aus Escherichia coli (DnaK) sowie HSP60 und HSP70 aus Chlamydia trachomatis.

Zur Herstellung des Tumorimpfstoffes eignen sich autologe Tumorzellen, die mit Hilfe mechanischer oder enzymatischer Methoden aus chirurgisch entferntem Tumorgewebe isoliert werden. Tumorzellinien, die von allogenen Tumoren gleicher Histologie stammen, können ebenfalls verwendet werden, ein Beispiel dafür sind Zellen einer Colonkarzinomlinie, wie z.B. die Linien LS174T oder LOVO. Der Impfstoff wird postoperativ verabfolgt, vor der Applikation werden die Tumorzellen durch radioaktive Bestrahlung devitalisiert.

Infolge der Bereitstellung dieses erfindungsgemäßen Tumorimpfstoffes durch Einschleusen des Gens eines exogenen Hitzeschockproteins und dessen Expression werden die Tumorzellen nachhaltig verfremdet und damit stärker immunogen. Das Gen des Hitzeschockproteins wird z.B. in den Vektor pcDNA3 (Invitrogen Corp.) insertiert. Die Einschleusung und Expression des Gens eines Hitzeschockproteins erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie z.B. durch Transfektion mit dem liposomalen Reagenz DOTAP (Boehringer Mannheim GmbH) nach Felgner et al. Proc Natl Acad Sci USA 84 (1987), 7413-7417, Li et al. Biochemica, 30-31 (1995).

Danach können Tumorimpfstoffe für die Behandlung von Patienten mit Karzinom, Sarkom, malignem Melanom, Leukämie oder malignem Lymphom hergestellt werden.

Gemäß der Erfindung werden auch biochemisch isolierte tumorassoziierte Antigene und synthetisch hergestellte an-

tigene Teilstrukturen verwendet. Ein tumorassoziiertes Antigen ist beispielsweise das Carcinoembryonale Antigen. Als synthetisch hergestellte antigene Teilstrukturen werden gemäß der Erfindung synthetisch hergestellte Mucinpeptide, insbesondere Monomere und Oligomere der Mucinpeptide MUC1 und MUC2 eingesetzt.

Der Tumorimpfstoff wird nach an sich üblichen Methoden unter sterilen Kautelen hergestellt, in dem das Hitzeschockprotein chemisch an die tumorassoziierten Antigene oder antigenen Teilstrukturen gebunden wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Tumorimpfstoff wird eine neuartige Strategie verfolgt. Durch die gentechnische Modifizierung von Tumorzellen mit dem Gen eines Hitzeschockproteins beziehungseise durch die Bindung an ein exogenes Hitzeschockprotein wird überraschend die Immunogenität von Tumorzellen und von tumorassoziierten Antigenen oder antigenen Teilstrukturen wirksam verstärkt, d.h. es wird dadurch erstmalig möglich, auch tumorassoziierte Antigene oder antigene Teilstrukturen gezielt einzusetzen und dadurch die durch T-Lymphozyten vermittelte Immunität zu stimulieren.

Die erfindungsgemäßen Tumorimpfstoffe werden für die Behandlung von Patienten mit Karzinom, Sarkom oder malignem Melanom verwendet und vorzugsweise postoperativ verabfolgt.

Patentansprüche

1. Tumorimpfstoff für die Immuntherapie von Tumoren enthaltend Tumorzellen, tumorassoziierte Antigene oder antigene Teilstrukturen, wobei die Tumorzellen das Gen eines exogenen Hitzschockproteins enthalten, und die tumorassoziierten Antigene oder antigenen Teilstrukturen an ein exogenes Hitzeschockprotein gebunden sind.

2. Tumorimpfstoff nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Tumorzellen devitalisierte autologe oder allogene Tumorzellen eingesetzt werden.

3. Tumorimpfstoff nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die tumorassoziierten Antigene oder antigenen Teilstrukturen biochemisch isoliert oder synthetisch hergestellt werden.

4. Tumorimpfstoff nach einem der Ansprüche 1 oder 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
als tumorassoziierte Antigene oder antigene Teilstrukturen synthetisch hergestellte Mucinpeptide verwendet werden.

5. Tumorimpfstoff nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, daß
synthetisch hergestellte Monomere oder Oligomere der Mucinpeptide MUC1 und MUC2 verwendet werden.

6. Tumorimpfstoff nach einem der Ansprüche 1 oder 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
als tumorassoziiertes Antigen oder antigene Teilstrukturen Carcinoembryonales Antigen oder antigene Teilstrukturen des Carcinoembryonalen Antigens verwendet werden.

7. Tumorimpfstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das exogene Hitzeschockprotein ein mikrobielles Hitzeschockprotein ist.

8. Tumorimpfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzeschockprotein das Protein HSP65 aus Mycobakterien ist.

9. Tumorimpfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzeschockprotein das Protein HSP70 aus Mycobakterien ist.

10. Tumorimpfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzeschockprotein das Protein HSP70 aus Escherichia coli (DnaK) ist.

11. Tumorimpfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzeschockprotein das Protein HSP60 aus Chlamydia trachomatis ist.

12. Tumorimpfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzeschockprotein das Protein HSP70 aus Chlamydia trachomatis ist.

13. Verwendung eines Tumorimpfstoffes nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Behandlung von Patienten mit Karzinom, Sarkom, malignem Melanom, Leukämie oder malignem Lymphom.

14. Verfahren zur Herstellung eines Tumorimpfstoffes nach einem der Ansprüche 1,2 und 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man in Tumorzellen die cDNA des Gens eines Hitzeschockproteins einschleust und dort zur Expression bringt.

15. Verfahren zur Herstellung eines Tumorimpfstoffs für die Immuntherapie nach den Ansprüchen 1 und 3 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Hitzschockprotein an die tumorassoziierten Antigene oder antigenen Teilstrukturen gebunden wird.